

BULLETIN

DU

DÉPARTEMENT DE L'AGRICULTURE

AUX

INDES NÉERLANDAISES.

N°. XXXVI

(Observations sur le thé, III)

BUITENZORG,
IMPRIMERIE DU DÉPARTEMENT
1910.

Sur la présence de levures dans le thé en fermentation, et leur influence éventuelle sur cette fermentation (1),

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

PAR

Dr. Ch. BERNARD.

A la dernière assemblée de la Soekaboemische Landbouw Vereeniging, Monsieur le Dr. Bosscha a présenté en mon nom (2) un certain nombre d'observations que j'avais faites et que je lui avais communiquées sur la présence de levures dans le thé en fermentation, et sur les hypothèses que l'on pouvait établir quant à l'influence exercée peut être par ces microorganismes sur les transformations subies par le thé au cours de ses diverses manipulations. J'avais effectué une partie de ces recherches à Taloen, où M. Bosscha avait mis à ma disposition toutes les facilités de travail. Je l'en remercie vivement, ainsi que de l'amabilité avec laquelle il a communiqué mes observations et de la bienveillance avec laquelle il a jugé les résultats obtenus par moi (3). Il m'a donné ainsi l'occasion de reprendre

**Fermenta-
tion.**

1). — Cette note a été publiée en hollandais sous le titre „Over de aanwezigheid van Gisten in fermenteerende thee en de eventueele invloed daarvan op de Fermentatie”. — Mededeelingen v. h. Proefstation voor Thee, V, 1909.

2). — Notulen der Algemeene Vergadering der Soekab Landb Vereen. gehouden op den 20^{en} Sept. 1909 te Soekaboemi — Het ferment van de thee. PP 26—34.

3). — Après avoir exposé certains des faits que nous discuterons ci-dessous, M. Bosscha a dit entre autres: „Les expériences de M. Bernard ont montré de façon péremptoire que, sur les feuilles de thé, se trouve normalement un ferment organisé qu'il a réussi à isoler et dont il a pu faire des cultures pures. M. Bernard constata qu'il s'agissait d'un champignon appartenant au groupe très répandu des *Saccharomyces*, auquel appartiennent également les levures du vin et de la bière. ... Les grandes différences que l'on peut relever dans le bouquet des vins ont leur analogue dans les arômes variés qui caractérisent les thés de diverses provenances, ce qui se trouve maintenant très clairement expliqué, puisque nous savons que, dans le thé aussi, une levure joue un rôle. Il n'est donc pas besoin d'insister sur ce fait que cette découverte est destinée à révolutionner l'industrie du thé qui devient donc, tout comme la fabrication du vin et de la bière, une industrie de fermentation (avec intervention de levures). Dès maintenant, on devra s'efforcer de cultiver le ferment du thé, et notamment d'obtenir des cultures pures de la variété de levure qui se montrera le plus favorable, et d'établir les conditions les meilleures pour son dévelop-

**Action éven-
tuelle de levures
dans la fermenta-
tion.**

**Fermenta-
tion.**

Les résultats
obtenus sont
encore peu
probants.

Des essais
méthodiques
devront être
entrepris.

ici la question et de l'exposer dans ses grandes lignes, tout en remettant au point certaines appréciations trop flatteuses qu'il a portées sur mon travail et qui, un peu prématurées, pourraient donner lieu à de fausses interprétations; on verra par cet exposé que, surtout lorsqu'on s'attaque à des sujets de nature aussi complexe, de fausses conclusions pourraient avoir les plus graves conséquences; il est urgent notamment de ne pas inculquer aux planteurs des idées non appuyées sur des faits absolument démontrés ou même des idées fausses qui pourraient les conduire à des erreurs de pratique. Aussi ne s'étonnera-t-on pas de la prudence avec laquelle j'expose mes observations et des restrictions que j'apporte à l'énoncé de mes conclusions. Mon intention n'était pas en effet de publier déjà des résultats encore fort peu probants et de leur donner une importance qu'ils n'ont pas en aboutissant à des conclusions qui peut-être seront démenties par la suite des recherches; car ce que M. Bosscha expose comme un résultat acquis dans un sens positif, ce n'est hélas qu'un résultat encore fort embryonnaire, et l'on verra par l'exposé des expériences que je me propose d'entreprendre, combien la question est compliquée, et combien elle est loin d'être résolue.

On a dit que des publications *préliminaires* étaient souvent *prématurées*, et je suis de cet avis. Mais enfin, je ne me soustrairai pas à l'obligation où les circonstances me mettent de traiter le sujet de façon provisoire, tout en me proposant de le reprendre plus en détail dans la suite. Pour le moment, je me contenterai d'exposer de façon aussi impartiale que possible les arguments qui semblent parler pour ou contre le rôle éventuel joué par les levures dans la fermentation du thé, je rappellerai sommairement les discussions auxquelles ce problème a donné lieu

„pement. Bien que, depuis longtemps, on ait pu supposer qu'un
„microorganisme spécial participe à la fermentation du thé, nous
„devons remercier M. Bernard qui, le premier, a isolé le ferment
„supposé, et ainsi fait faire un grand pas à la science du thé.”

jusqu'ici, les expériences faites par les divers auteurs et enfin je résumerai les conclusions qui découlent de ces expériences, et tout ce qui reste à faire pour arriver à une solution définitive de la question. Un autre avantage que cette note préliminaire aura encore, sera peut-être d'attirer l'attention des planteurs sur certains faits qu'ils nous signaleront et que nous pourrons enregistrer comme arguments dans un sens ou dans l'autre.

Si on laisse de côté tous les détails accessoires, et toutes les théories plus ou moins fondées qui pourraient surgir, la question se pose ainsi:

1°. Dans la fermentation du thé, y a-t-il simple oxydation, phénomène chimique spontané, ne nécessitant aucune autre intervention que la présence de l'oxygène de l'air?

2°. Ou bien cette oxydation est-elle provoquée par l'intervention d'un ferment soluble, une enzyme contenue dans les cellules de la feuille de thé, et pouvant fixer ou bien l'oxygène de l'air (enzymes connues sous le nom d'oxydases) ou bien de l'oxygène à l'état actif mis en liberté par décomposition de peroxydes (enzymes connues sous le nom de peroxydases)? Cette théorie, il faut le dire dès maintenant, est le plus généralement admise par les savants qui prétendent avoir isolé de la feuille de thé une oxydase qu'ils ont appelée „théase”.

3°. Enfin, la fermentation sera-t-elle provoquée par des ferments solubles contenus non pas dans la feuille du thé, mais dans des cellules de microorganismes (parmi lesquels il faudra distinguer les levures et les bactéries), qui viendraient par conséquent jouer dans le phénomène ou bien un rôle principal ou bien, ce qui est possible aussi, un rôle secondaire. C'est ce dernier côté de la question que nous nous sommes proposé d'élucider.

Fermentation.

Oxydation directe par l'oxygène de l'air?

Oxydation sous l'influence d'enzymes se trouvant dans les cellules de la feuille de thé?

Oxydation sous l'influence d'enzymes contenues dans les cellules de microorganismes.

**Fermenta-
tion.**

Il y a des arguments pour et contre les diverses théories.

Je m'empresse de le dire au début de cette note préliminaire, après avoir autant que possible fait abstraction des idées admises, après avoir repris la question dès le commencement, après avoir groupé les faits contradictoires et les avoir comparés entre eux, je ne puis me prononcer encore, et je n'oserais jusqu'ici affirmer dans quel sens la question doit être résolue : tandis que certains arguments semblent parler en faveur de l'une des manières de voir, des observations tout aussi fondées viennent appuyer plutôt l'autre théorie. Et, à l'heure actuelle, il serait aussi désastreux d'admettre dans les fabriques de thé l'idée préconçue que la fermentation a lieu sous l'influence de levures, qu'il serait fâcheux de poser a priori le postulat contraire, à savoir que les microorganismes ne sauraient jouer aucun rôle dans le phénomène, ou même qu'ils ne peuvent exercer qu'une action néfaste. On risquerait ainsi d'aboutir dans les deux cas à des conclusions fausses.

Je dis plus haut que j'ai essayé de me débarrasser au début de toute idée préconçue ; c'est en effet mon opinion que, dans un travail de cette nature, dans un sujet qui, jusqu'ici, a été très sommairement étudié, on doit reprendre le problème comme si rien n'avait été fait, de façon à ne pas se laisser influencer au cours des expériences par telle ou telle donnée séduisante qu'on interprètera instinctivement en faveur d'un point qu'on désire démontrer ; on ne doit établir une conclusion, on ne doit admettre un point comme acquis, que sur les observations qu'on a faites soi-même et qu'on a contrôlées de façon méthodique. C'est pour cette raison, cela va bien sans dire, que de semblables recherches sont fort longues, et elles le sont d'autant plus que, au cours des expériences, se posent, comme on le verra, toute une foule de problèmes principaux ou accessoires qu'il s'agit d'élucider en passant ; en outre, ces recherches sont très délicates, et doivent se baser sur des expériences assez compliquées à établir ; cela n'aura donc rien

d'étonnant si on n'arrive pas en quelques semaines à des résultats précis, ce qui pourrait être le cas si l'on admettait comme démontrés toute une série de faits dont beaucoup ne sont pourtant que des suppositions toutes gratuites.

Si je dis qu'au début de semblable étude il est nécessaire de se débarrasser de tout bagage acquis, cela ne veut pas dire qu'il faille éviter toute sorte d'hypothèse, et je ne prétends pas l'avoir fait: je ne prétends pas qu'une des théories ne m'ait séduit plus que l'autre; je veux bien volontiers dire que j'espère pouvoir démontrer une participation des levures au phénomène de fermentation; mais, je le répète, les faits étant étudiés impartialement, ceux qui contredisent cette proposition sont tout aussi nombreux que ceux qui l'appuient.

Nous nous contenterons ici de rappeler brièvement où en est actuellement la question, et quand nous la reprendrons dans une publication plus détaillée, nous examinerons de plus près les arguments avancés et nous discuterons plus à fond les théories émises.

*
* *

Pendant longtemps on a fait subir au thé les diverses manipulations, et notamment celle connue sous le nom de fermentation, de façon tout à fait empirique, sans se demander quels agents prenaient part au phénomène et sans prévoir même que, en modifiant tel ou tel point, on pourrait notablement améliorer tout le procès. Mais, lorsqu'on eut remarqué que, dans les espaces mal aérés, la fermentation n'avait pas lieu, ou se faisait de façon insuffisante, on tira cette première conclusion importante que le phénomène, dans ses grandes lignes, repose sur une oxydation.

Je veux relever ici déjà une confusion fréquemment faite, comme j'aurai à en signaler plusieurs au cours de cette étude: ce sujet si difficile et si complexe, encore si mal connu, est souvent discuté

Fermentation.

Les diverses hypothèses doivent être impartialement étudiées.

La fermentation se faisait autrefois de façon empirique.

La fermentation repose sur une oxydation.

**Fermenta-
tion.**

Les termes
oxydation
et **fermenta-
tion** ne s'exclu-
ent pas l'un
l'autre.

Ferments solu-
bles.

Ferments orga-
nisés.

par des personnes peu au courant de la question, et qui emploient abusivement certains termes, faussant ainsi l'opinion de leurs lecteurs, leur inculquant des idées contradictoires et introduisant dans leurs connaissances des confusions qu'il est ensuite fort difficile de faire disparaître. On a souvent dit par exemple: „La fermentation du thé n'est pas une fermentation, c'est une oxydation". Mais cette interprétation repose sur un malentendu, car les deux termes *oxydation* et *fermentation* ne s'excluent pas l'un l'autre; on ne peut les opposer l'un à l'autre, car une oxydation est une fermentation quand elle a lieu sous l'influence d'un ferment soluble, celui-ci pouvant provenir de divers corps vivants (substances végétales ou animales), et existant par exemple dans les cellules de microorganismes (bactéries ou levures) qui fonctionnent alors comme ferments et qui sont désignés sous le nom de ferments figurés, ou de ferments organisés.

Il faut rappeler ici, sans entrer dans les détails, que la notion de „ferment" a, dans ces dernières années, pris un sens beaucoup plus général et que les savants qui se sont occupés des fermentations n'ont plus limité le terme de ferment, comme on l'avait fait autrefois, à un petit nombre de corps cellulaires susceptibles de provoquer des fermentations (oxydations, hydrolisations, hydrogénations, etc.). Ils ont appliqué ce nom à toutes les substances qui ont une action considérable comparativement à la quantité très restreinte de cette substance qui entre en jeu, et cette notion de ferment sera donc applicable non seulement aux microorganismes, mais aussi aux substances organiques connues sous le nom de ferments solubles (zymases, diastases, oxydases, peroxydases, catalases, laccases, etc.) et extraites des cellules de ces microorganismes, ou des cellules d'autres corps vivants; en outre elle sera applicable à la foule des substances qui, dans les réactions chimiques, ont une action disproportionnée avec leur quantité,

et qui provoquent les phénomènes dits catalytiques; les chimistes se sont donc mis à désigner sous le nom de ferments inorganiques ces substances catalysatrices, dont un exemple bien connu nous est fourni par la mousse de platine ou le platine très finement divisé.

Dès le moment où nos connaissances des ferments se sont enrichies des remarques brièvement exposées ci-dessus, on s'est demandé aussitôt si un ferment appartenant à l'une ou l'autre des catégories (ferment figuré ou ferment dit „soluble”), ne pourrait pas intervenir dans le phénomène de la fermentation du thé.

L'idée que des microbes peuvent prendre part aux modifications subies par la feuille de thé n'est pas nouvelle; émise par Kozai (1) en 1891, elle fut reprise plus tard (1903) par Wahgel (2) qui attribuait à des bactéries spéciales le développement de l'arôme du thé. Mais bientôt cette opinion fut combattue par la plupart des auteurs qui se sont occupés de la question, et actuellement la manière de voir qui prévaut est que la fermentation du thé a lieu sous l'influence d'un ferment soluble, une enzyme, mais que cette substance ne serait pas sécrétée par un microorganisme: elle préexisterait (ou se développerait) dans certaines cellules de la feuille de thé, serait mise en liberté par brisement des cellules au cours du roulage, et agirait sur des substances contenues dans d'autres cellules de la feuille, pour provoquer leur oxydation, les décomposer et produire ainsi les substances caractéristiques qui se trouvent dans le thé préparé.

Je ne veux pas faire un long historique du sujet; en quelques mots seulement je veux résumer la bibliographie et dire sur quelles expériences et sur quels raisonnements on s'est basé pour appuyer cette ma-

Fermentation.

Ferments inorganiques.

Influence de microorganismes.

Recherches des Kozai et de Wahgel.

Influence d'un ferment soluble qui se trouve dans les feuilles.

1).— Kozai.— Researches on the manufacture of various kinds of Tea.— Tokyo, 1891.

2).— Wahgel.— Ueber Theegährung.— Chem. Zeitung, 1903.

**Fermenta-
tion.**

Bamber
retire de la
feuille de thé
une oxydase à
laquelle **New-
ton** donna plus
tard le nom de
théase.

Recherches de
Mann.

nière de voir. Ce court exposé nous servira à discuter ensuite nos propres remarques. On trouvera du reste cette question exposée avec suffisamment de détails dans l'excellent livre de Neuville, „la Technologie du Thé” (1), dans les chapitres notamment où il traite de l'enzyme du thé (théase), P. 50—61, du flétrissage, P. 88—91, et surtout de la fermentation, P. 113—158.

Sans qu'ils l'aient énoncé de façon péremptoire, il semble que Bamber d'un côté, Nanninga de l'autre aient prévu à peu près à la même époque qu'un ferment devait jouer un rôle dans la fermentation du thé.

C'est en 1900 seulement cependant que Bamber (2) publie qu'il a réussi à isoler des feuilles du thé une enzyme possédant les propriétés des oxydases et agissant sur les sucres de la feuille mis en liberté par le bris des cellules au cours du roulage, pour provoquer les phénomènes caractéristiques de la fermentation. La dessiccation, en soumettant le thé à une température assez élevée, aurait pour principal effet de détruire l'enzyme et d'arrêter par conséquent son action.

C'est Newton (3) qui donne à cette oxydase le nom de théase. A côté d'elle, il existe encore certainement dans le thé d'autres enzymes, peut-être fort importantes elles aussi, mais qui, encore peu connues, peuvent être pour le moment passées sous silence; la plupart des auteurs n'en ont en effet, et probablement à tort, pas tenu le moindre compte.

Mann (4) a étudié très en détail cette question et a publié plusieurs travaux sur le ferment de la

1).— Nous avons donné, dans notre Mededeeling No. I. un compte-rendu de ce livre

2).— Bamber.—Report on Ceylon tea soils and their effects on the quality of tea.—Colombo, 1900.

3).— Newton.—Oxydising Enzymes.—Indian Gardening, 1901.
—The fermentation of the tea leaf.—Ind. Gard. 1901.
—The new process for fermenting tea.—Tropical Agriculturist, 1902.

4).— Mann.—The ferment of the tea leaf. I, II, III.—Calcutta, 1902, 1903, 1904.

feuille de thé. Il a isolé l'enzyme et est arrivé à la conclusion qu'elle est susceptible de provoquer l'oxydation du tannin et des huiles essentielles contenues dans la feuille, et que ainsi s'expliquerait la disparition souvent presque totale du tannin dans le thé fermenté, et le développement de l'arome.

Bamber (1) n'est point d'accord avec Mann et, tout en admettant que l'enzyme est effectivement l'agent actif de la fermentation, il se base sur des arguments ingénieux pour nier qu'elle ait une influence quelconque sur le développement de l'arome.

En même temps que ces auteurs anglais, van Romburgh et Lohman et surtout Nanninga (2) continuaient à Java leurs recherches sur le même sujet et aboutissaient à des conclusions analogues, dans leurs grandes lignes, à celles de Mann.

Cependant, l'ancienne idée de Kozai que des microorganismes peuvent jouer un rôle dans la fermentation n'est pas totalement abandonnée, puisque nous avons vu que Wahgel, en 1903, estime que le développement de l'arome est dû à l'intervention de bactéries. Pourtant, les autres auteurs, ceux qui ont porté leur attention plus spécialement sur les enzymes de la feuille, croient pouvoir affirmer, sur la foi de leurs expériences, que des microorganismes ne sauraient jouer aucun rôle dans le phénomène de la fermentation, et qu'ils auraient même plutôt une action néfaste. C'est Mann surtout qui mit en avant cette idée, et il est arrivé à cette conclusion que toutes les manipulations du thé devaient se faire de façon aussi propre, et même aussi aseptique que possible. Il en était même venu à recommander d'ajouter au thé en fermentation des substances antiseptiques, notamment de l'acide salicylique, mais

Fermentation.

Recherches de
van Romburgh et
Lohmann et
de **Nanninga**.

D'après
Mann, les
bactéries exer-
ceraient une
action nuisible.

1) — Bamber.—What produces the flavour in Tea.—Indian Gardening, 1901.

2).— Il n'est pas nécessaire de résumer ici en détail les publications de ces auteurs; elles sont déjà entre les mains de la plupart des planteurs de Java, et elles ont été discutées de façon assez complète dans le livre de Neuville. Toutes ces observations ont d'ailleurs été consignées dans leurs grandes lignes dans les "Verslagen over de onderzoekingen betreffende op Java gecultiveerde theeën", 1895-1906.

Fermentation.

Adjonction de substances anti-septiques au thé en fermentation.

il abandonna plus tard cette idée et déconseilla cette adjonction. Divers auteurs ayant observé une fermentation se produire en présence de vapeurs de chloroforme, ils prétendaient voir dans ce fait une preuve de la non-intervention de microorganismes; mais, comme cela leur a été judicieusement objecté, ces mêmes auteurs, qui admettaient l'intervention d'une enzyme contenue dans la feuille, négligeaient cette observation bien souvent faite que l'action des ferments solubles est, tout comme celle des ferments figurés, retardée, puis arrêtée par les vapeurs de chloroforme.

On voit, par ces quelques mots, combien la question est compliquée, et combien il serait imprudent de conclure dans un sens ou dans l'autre, avant que des expériences sérieuses, plusieurs fois répétées et toujours concordantes soient venues nous donner une certitude. Nous verrons plus loin toutes les difficultés qui surgissent au cours des recherches sur les ferments, nous verrons notamment combien il est difficile d'isoler l'une de l'autre l'action éventuelle des ferments figurés et celle des ferments solubles qui pourraient se trouver côte à côte. Si nous ne perdons pas de vue ces difficultés qui nous arrêteront presque à chaque pas dans notre étude, nous comprendrons que des auteurs qui travaillent sur des bases identiques arrivent à des conclusions contradictoires, et même reviennent sur leurs précédentes opinions.

Je veux maintenant exposer les considérations sur lesquelles on s'est basé pour refuser aux microorganismes toute action dans le phénomène de la fermentation du thé, puis les remarques que l'on a faites qui semblent parler au contraire en faveur de semblable intervention, et sur lesquelles je me suis appuyé pour entreprendre de nouvelles recherches notamment au sujet des levures.

La principale objection que l'on peut faire à la théorie qui voudrait considérer la fermentation du thé comme

Arguments qui parlent contre l'intervention de microorganismes.

provoquée par des microorganismes (1) est la suivante: cette fermentation est un phénomène trop rapide pour que l'on puisse admettre une action d'éléments figurés, ceux-ci n'ayant pas à leur disposition un laps de temps suffisant pour se développer en grand nombre et pouvoir ainsi exercer un maximum d'action. Cette objection, je le reconnais, est sérieuse et c'est elle qu'il faudra d'abord réfuter expérimentalement avant d'aller à la recherche d'arguments positifs. En effet, si l'on admettait la fermentation et par conséquent le développement des microorganismes limités aux quelques heures et souvent aux quelques minutes que le thé passe dans les cadres avant d'être mis dans les dessiccateurs, ce temps serait matériellement trop court pour que des organismes aient pu se développer en nombre suffisant et exercer une action fermentescible. Mais si l'on songe que les levures par exemple qui, comme je le démontrerai, sont en petit nombre sur les feuilles dans les jardins, se développent vivement, comme cela découlera aussi de mes recherches, au cours du flétrissage, on peut en conclure qu'elles ont 24 heures au moins à leur disposition pour devenir très abondantes. Si, de plus, on constate que, dans certaines fabriques, où justement la fermentation est rapide, le thé est soumis dans les locaux de flétrissage à une température assez élevée, et si l'on admet, comme c'est probable, et comme ce sera, je l'espère, facile à prouver, que cette température est justement celle à laquelle les levures se développent le plus abondamment (température optimum), alors on comprendra que les feuilles, au moment où elles sont placées dans les rouleurs, sont toutes couvertes de ces levures en état de vie très active, et dont la très grande abondance empêche d'admettre a priori l'objection ci-dessus énoncée,

Fermentation.

Rapidité de la fermentation.

Augmentation du nombre des cellules de levures au cours du flétrissage.

1). J'emploie toujours le terme de microorganismes quand je ne veux pas préciser si j'entends parler de levures ou de bactéries; je pourrais employer l'expression de microbes, mais cela prêterait peut-être à confusion, ce mot étant souvent considéré comme synonyme de bactérie.

**Fermenta-
tion.**

Fermentation en
présence de va-
peurs de chloro-
forme.

Faits qui parlent
en faveur d'une
action des micro-
organismes.

à savoir le manque de temps, et s'oppose à ce qu'on puisse sans discussion repousser l'idée d'une intervention des microorganismes. Les autres arguments dont on se sert contre la théorie des levures sont d'abord le résultat donné par les expériences de Mann, de van Romburgh, de Nanninga, d'une fermentation en présence de vapeurs de chloroforme, et dont nous avons exposé ci-dessus les conclusions; et ensuite les observations de Mann que les *bactéries* (je souligne le mot bactéries) jouent un rôle néfaste dans le thé en voie de fermentation. Et ce sont là tous les arguments négatifs que nous trouvons exposés dans la littérature pour refuser aux microorganismes un rôle dans la fermentation du thé.

Voyons maintenant les faits qui parlent dans une autre direction, faits que nous discuterons en détail, que nous expérimenterons et sur lesquels, s'ils nous paraissent suffisamment démonstratifs, nous établirons nos conclusions. Ces faits ont été en partie exposés par M. le Dr. Bosscha dans sa communication à la Soekaboemische Landbouw Vereeniging.

Notre attention fut d'abord attirée par quelques essais faits en petit dans le laboratoire, essais qui ne furent pas définitivement contrôlés, mais qui, disposés de la même manière que ceux de Mann, Bamber, Nanninga, paraissaient donner des indications sensiblement différentes de celles obtenues par ces auteurs, soit en ce qui concerne l'action du chloroforme et autres antiseptiques, soit en ce qui concerne l'action des enzymes. Puis nous remarquâmes les contradictions entre les divers auteurs quant à l'action des enzymes, et enfin, ce furent des remarques faites dans la pratique et dont la plupart nous furent d'abord signalées par Monsieur K. A. R. Bosscha, de Malabar :

Dans certaines fabriques, le thé fermente beaucoup plus rapidement que dans d'autres, sans qu'il y ait pour cela de raisons apparentes, les conditions de fabrication étant d'ailleurs toutes égales ou à peu près.

Dans des fabriques construites depuis peu, et où le thé fermentait très lentement, on apporta du thé en fermentation pris dans une fabrique où le phénomène était rapide, et presque immédiatement le thé se mettait à fermenter rapidement dans la fabrique où d'abord l'opération était trop lente; il semblait que cet apport de thé étranger, dont on avait frotté les cadres à fermenter, avait inoculé à ceux-ci des organismes qui leur manquaient. Les données suivantes, empruntées à la publication de M. le Dr. J. Bosscha ou qui m'ont été communiquées par M. K. A. R. Bosscha, illustrent ces indications:

„Dans la fabrique de Malabar, dit M. J. Bosscha (P. 26), le temps nécessaire pour que le thé roulé „soit complètement fermenté était autrefois d'environ „4 heures. Soudain, cette durée de fermentation a diminué, et depuis lors le thé le plus fin passe directement „du „ball breaker” dans le séchoir, sans subir de fermentation, tandis que le thé plus grossier (le „badak”) „n'est fermenté qu'une demi-heure.”

A Tanara, où autrefois on devait fermenter plusieurs heures, le phénomène ne dure actuellement (après qu'on a transporté à Tanara le thé rapidement fermenté de Malabar) qu'un temps très court. A Wanasoeka, où la fermentation était très lente (6—7 heures), on transporta également du thé fermenté de Malabar, et on obtint le même résultat qu'à Tanara.

Cela va même si loin que dans certaines fabriques, à Radjamandala par exemple, l'opération dite de „fermentation” est supprimée complètement, le thé passe directement du rouleur dans le dessiccateur sans que la qualité du produit soit considérée comme notablement différente de celle du thé obtenu dans des fabriques situées dans des conditions analogues; cela ne veut pas dire, naturellement, que le procès de fermentation n'ait pas eu lieu, cela signifie seulement qu'il est terminé à la fin du roulage; nous reviendrons plus loin sur cette question.

Fermentation.

Le temps de fermentation est très variable dans les diverses fabriques.

Il est possible de diminuer le temps nécessaire à la fermentation.

Fermentation.

Les divers arguments devront être contrôlés expérimentalement.

Adjonction à la feuille en voie de fermentation, de jus longtemps fermenté.

Tous ces faits ne sont pas encore des preuves; mais ce sont des indications qui méritent d'être expérimentées et contrôlées par des observations plus nombreuses, et qui, seulement alors, pourront être considérées comme des faits probants. La possibilité n'est pas exclue par exemple que, au moment où on a introduit dans les fabriques à fermentation lente du thé en voie de fermentation rapide, on ait en même temps modifié quelque point de la fabrication, qu'on ait apporté par exemple quelque changement dans le flétrissage. Si on avait augmenté la chaleur des chambres à flétrir, cela aurait parfaitement pu exercer une action sur la fermentation, quoique, il est vrai, cela encore ne s'opposerait pas à l'idée d'une intervention de levures, puisque, comme je l'ai déjà dit, une modification dans la température peut justement mettre les levures dans leurs conditions optimum de développement. En tout cas, tous ces détails sont des points à examiner de très près, avant de pouvoir conclure.

Un autre planteur nous a communiqué encore le renseignement suivant: il avait modifié comme suit la fabrication: chaque jour il récoltait sous le rouleur du jus de thé, il le laissait fermenter pendant 24 heures, et l'ajoutait le lendemain au thé en voie de fermentation; il attribuait à cette opération l'arome très apprécié de son thé. Il faudrait, cela va sans dire, contrôler scientifiquement cette observation empirique; c'est ce que je me propose de faire; je la transcris seulement ici comme une indication; mais, si elle se confirmait, ne pourrait-elle pas venir à l'appui de la théorie suivante: les microorganismes participent au développement de l'arome du thé; si on laisse du jus fermenter pendant 24 heures, les levures s'y développeront en grand nombre, et il sera avantageux d'ajouter ensuite ce jus au thé en fermentation.

Enfin, je considère encore comme des indications (j'insiste sur ce point que je ne les considère pas encore comme des preuves) les quelques résultats,

auxquels je suis arrivé par mes triages et cultures de levures et par les essais d'extraction des enzymes que j'ai commencé d'entreprendre en collaboration avec M. Welter. Ce sont ces résultats provisoires que j'expose plus loin.

J'ajoute encore une remarque que j'ai pu faire à plusieurs reprises: j'ai observé que du jus exprimé des feuilles au cours du roulage ou au commencement de la fermentation donne un assez fort dégagement gazeux, une sorte d'écume abondante qui ne se produit plus lorsque la fermentation est achevée.

*
* *

Au début de semblable étude, il est nécessaire tout d'abord d'apporter de la clarté dans toute une série de faits en apparence élémentaires, et avant tout il est urgent d'établir ce que sont les ferments que nous nous proposons de discuter; je me contente d'un exposé sommaire de la question qui sera reprise en détail dans la suite.

Quand on consulte les ouvrages de certains auteurs, la question des enzymes, schématisée, „vulgarisée”, apparaît être d'une simplicité enfantine: on extrait des enzymes, on les purifie, on s'en sert pour opérer des réactions qui donnent toujours de merveilleux résultats; en réalité ce n'est pas si simple, et les enzymes sont des substances très délicates, très compliquées, au sujet desquelles les théories les plus diverses ont été énoncées. Il suffira, pour donner une idée de ce problème difficile à résoudre, de rappeler une théorie ingénieuse qui a été mise en avant par les enzymologues Chodat et Bach, théorie dont nous aurons sans doute à tenir compte dans la suite.

On sait que, parmi les enzymes fréquemment rencontrées chez les végétaux, on a isolé tantôt des oxydases (ferments qui bleussent directement l'émulsion de résine de gaïac, émulsion qui, en s'oxydant, prend une belle couleur bleue), tantôt des peroxydases (ferment qui ne bleussent le gaïac qu'en présence

Fermentation.

Du jus de thé exprimé avant la fin de la fermentation donne un dégagement de gaz.

Diverses hypothèses concernant l'action des enzymes.

Oxydases.

Peroxydases.

Fermentation.

Une oxydase
serait une combinaison de deux
ferments.

Théorie de
**Chodat et
Bach.**

de l'eau oxygénée, ou d'un autre peroxyde; en d'autres termes, ferments qui sont capables de mettre en liberté de l'oxygène actif à partir de ces peroxydes).

D'après la théorie des deux auteurs en question, théorie qui est logiquement appuyée sur des faits, une oxydase ne serait pas un ferment simple, ce serait une combinaison de deux ferments qu'on a d'ailleurs pu isoler l'un de l'autre et étudier séparément; un de ces ferments aurait la nature des peroxydes (les auteurs l'ont appelé oxygénase), l'autre serait une peroxydase; ce dernier ferment agirait sur le peroxyde (oxygénase), mettrait en liberté de l'oxygène atomique, donc à l'état actif, qui pourrait oxyder le gaiac. Isolés l'un de l'autre, ces deux ferments n'ont donc aucune action oxydante, ils ne peuvent bleuir le gaiac; mais la peroxydase, étant mélangée à un peroxyde qui pourra être soit l'eau oxygénée, soit l'oxygénase, soit toute autre substance de la nature des peroxydes, le mélange acquiert un pouvoir oxydant, et c'est ce mélange qui était considéré comme un ferment simple sous le nom d'oxydase.

Je simplifie ces données qui en réalité sont plus complexes; il suffit d'en exposer ici le principe.

Si nous appliquons maintenant ce principe à ce que nous connaissons chez le thé, nous voyons que les auteurs, qui ignoraient cette théorie, ont eu tort de s'exprimer en disant qu'on extrait du thé tantôt de l'oxydase et tantôt de la peroxydase, tantôt des ferments actifs et tantôt des ferments inactifs. Quand on isole du thé une substance oxydant directement le gaiac, on a extrait le mélange des deux ferments: oxygénase (peroxyde)+peroxydase; quand on a isolé un ferment qui ne bleuit le gaiac qu'en présence de l'eau oxygénée, on n'est parvenu à extraire qu'un des ferments du mélange, la peroxydase, toujours plus stable, d'après ces auteurs, que l'oxygénase.

Ceci, pour ce qui concerne le thé, n'est qu'une hypothèse, je me hâte de le dire; c'est une application à la plante qui nous intéresse de la théorie de Bach

et Chodat (1), théorie qu'il sera nécessaire de chercher à démontrer selon les méthodes indiquées par ces auteurs; cette hypothèse nous semble cependant jeter quelque lumière sur les divergences qui existent entre les opinions des divers auteurs; elle explique peut-être aussi que, jusqu'ici, nous ne soyons parvenus à isoler de la feuille de thé, soit fraîche, soit flétrie, que de la peroxydase. En outre, ne faudra-t-il pas tenir compte aussi d'un autre ferment la catalase, qui existe dans la plupart des substances vivantes et que nous avons pu mettre toujours en évidence dans la feuille de thé. On a toujours mis de côté ce ferment, qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée, mais en mettant en liberté non plus de l'oxygène actif (atomique), mais de l'oxygène moléculaire. On ne tient pas compte de ce ferment parce qu'on ignore quel peut être son rôle, mais très vraisemblablement on a tort de le passer ainsi sous silence, car il est trop répandu pour qu'il n'ait pas son importance.

A propos de la fermentation du thé, nous avons vu, P. 6, qu'on a souvent opposé *fermentation* à *oxydation*, en disant qu'on n'a pas affaire à une vraie fermentation, mais à une oxydation; c'est un tort à mon avis de schématiser ainsi le phénomène, car si le brunissement du tannin, par exemple, qui a lieu spontanément à l'air est peut-être (2) une oxydation dans le sens étroit du mot, l'action due à un ferment oxydant n'en est pas moins une oxydation, tout en étant une fermentation, le ferment pouvant être ou bien isolé à l'état d'enzyme plus ou moins pure, ou bien être excrété par un microorganisme. Et si autrefois on admettait une séparation nette entre les phénomènes chimiques et les phénomènes biologiques, si on admettait

Fermentation.

Catalase.

Les fermentations n'ont pas lieu seulement sous l'influence d'organismes vivants, mais sous celle de ferments dans le sens le plus large du mot.

1).— Ces deux auteurs ont publié toute une série d'observations sur ce sujet; la plupart ont paru dans les Ber. d.d. chem. Gesellschaft 1902—1904, etc.

2).— Je dis „peut-être”, car il n'est pas démontré qu'un agent catalysateur ne prenne pas part à cette réaction, agissant comme un ferment, et une théorie moderne veut que les oxydations lentes aient toujours lieu sous l'action de catalysateurs, sortes de ferments inorganiques connus ou non, et dont nous avons déjà dit quelques mots ci-dessus.

Fermentation.

Les levures agissent comme ferments quand elles contiennent ou secrètent une enzyme qui prend part à la réaction.

que les oxydations étaient des phénomènes chimiques purs, tandis que les fermentations n'auraient eu lieu que sous l'influence de corps organisés vivants, microbes ou autres, nos connaissances actuelles des ferments solubles et la notion plus récente de ferments inorganiques ont bien modifié cette ancienne manière de considérer les choses, et ce n'est plus maintenant la notion „être vivant” qui a son importance dans les phénomènes de fermentation, c'est la notion „ferment” dans son sens le plus large.

Il faut relever ici que c'est encore un reste de ces anciennes notions qui fait que certains auteurs considèrent comme ferments seulement les corps organisés, les microorganismes, qu'on désigne parfois sous le nom de ferments figurés, et qu'ils opposent ces „ferments” aux enzymes. C'est une grave confusion, qu'il convient de mettre au point, car elle risquerait de fausser les idées dès l'exposé de la question. Une levure par exemple, n'agit comme ferment que si elle contient (ou secrète) un ferment soluble, une enzyme. On ne peut donc opposer le terme „enzyme” au terme „ferment”. Ceci n'est du reste qu'une question de principe et cette réflexion nous conduit à formuler comme suit la question que nous voulons traiter: les phénomènes qui ont lieu dans la feuille de thé au cours du procès dit de „fermentation” sont-ils provoqués par la présence d'un ferment, et si oui, ce ferment se trouve-t-il préformé dans la feuille de thé, ou s'y développe-t-il au cours des diverses manipulations, ou bien est-il produit par des microorganismes?

Je souhaiterais que la question fût aussi près d'être résolue que M. le Dr. Bosscha l'a affirmé, et que j'eusse fait la découverte qu'il m'attribue: isolement d'un microorganisme (levure) qui aurait *certainement* la propriété de provoquer la fermentation du thé. Je dois, hélas, me contenter de répéter ici que la question n'en est pas aussi loin; je ne puis me prononcer ni dans un sens ni dans l'autre.

Fig. 1.



Fig. 2.



et je ne puis qu'exposer l'état actuel de mes recherches tout en osant à peine formuler l'espoir qu'elles me conduiront finalement au résultat désiré, et considéré hâtivement comme acquis.

Il est encore une autre confusion qu'il faut se garder de faire et qu'on a malheureusement faite à plusieurs reprises jusqu'ici: la plupart des auteurs qui ont refusé aux microorganismes toute participation à la fermentation du thé et qui ont établi des expériences pour appuyer leur manière de voir, n'ont compris sous cette dénomination de microorganismes que les bactéries, sans tenir compte des levures. Mais nous verrons plus loin que, s'il est facile en effet de mettre en évidence l'action néfaste exercée par les bactéries quand elles se développent dans le thé en fermentation, il n'est nullement démontré que d'autres microorganismes, et notamment les levures, dont on n'a point tenu compte jusqu'ici, jouent semblable rôle. Nous devons donc, au cours de cette recherche, porter notre attention sur ces deux sortes d'organismes et ne pas confondre leur action.

Très sommairement nous rappellerons que les *bactéries* (Fig. 1) sont admises actuellement par la plupart des biologistes comme appartenant à un groupe d'*Algues* fort inférieures, dont les cellules sont dépourvues de noyau différencié, et qui se divisent le plus souvent par simple bipartition; en outre, par suite de leur mode de vie saprophytique ou parasitaire, ces algues ont pris des dimensions excessivement restreintes et ont perdu leur matière colorante. Les *levures* (Fig. 2), qui, elles aussi, trouvent leur nourriture carbonée dans des substances organiques, ne sont pas davantage colorées que les bactéries, mais leur constitution est un peu plus complexe; elles appartiennent à la grande classe des *Fungi*, et leurs cellules, d'ordinaire notablement plus grandes que celles des bactéries, ont leur contenu différencié à la manière des autres cellules végétales: il est constitué de protoplasma et d'un noyau. Ce

Fermentation.

Il n'est point démontré que la fermentation du thé ait lieu sous l'influence d'une levure.

Bactéries.

Levures.

Fermentation.

Formation de spores chez certaines levures

Action de certaines levures sur divers sucres.

dernier, au moment de la multiplication des cellules, se divise selon un procédé assez compliqué et du reste encore peu connu chez les levures. Quelques-unes d'entre elles, comme par exemple les *Saccharomyces* peuvent, sous certaines conditions, diviser leur contenu en plusieurs cellules qui sont des spores. Beaucoup d'autres ne forment pas de spores, mais il est possible qu'on ignore encore les conditions où il faudrait placer ces organismes pour qu'ils puissent produire ces formes de reproduction. Il existe des levures qui peuvent provoquer la fermentation de certains sucres et d'autres qui ne possèdent pas ce pouvoir fermentescible. Sur la présence des spores, et sur ces fermentations, on a basé des caractères systématiques pour distinguer les levures.

Cette description sommaire suffit pour exposer ce dont il s'agit. Il est pourtant nécessaire de dire encore deux mots sur quelques détails de technique auxquels il sera fréquemment fait allusion, par exemple sur la manière de rechercher les microorganismes, de les isoler les uns des autres et de les cultiver.

Il va sans dire que, comme partout dans la nature, il existe sur la feuille de thé, où que ce soit qu'on la prenne, de nombreux microorganismes de toutes sortes, des bactéries, des levures, des spores de moisissures, etc. Il importe donc de travailler de telle manière qu'on puisse obtenir *seul* le type qu'il s'agit d'étudier. Et l'on arrive à ce résultat par les méthodes de triage bien connues de tous ceux qui ont fait un peu de microbiologie. Comme les premières expériences nous ont montré que c'était sur des levures que notre attention devait se porter, nous avons agi en sorte d'obtenir l'isolement de ces levures à l'exclusion des autres organismes, en d'autres mots, d'avoir des *cultures pures* de ces levures.

Triages.

Cultures pures.

Pour cela, on opère de la façon suivante: on prépare d'abord un milieu approprié, c'est-à-dire où les organismes se développent avec rapidité et abondance; s'il avait été certain que nous devions porter notre

attention sur des *Saccharomyces*, nous aurions choisi comme substratum des milieux riches en glucose qui donnent d'ordinaire, avec ces espèces, le meilleur résultat; mais tel n'était pas le cas, ou du moins nous ignorions au début si nous nous trouvions en présence de *Saccharomyces*, et nous avons dû travailler un peu à l'aventure; il nous a semblé que le mieux était, si ces levures se développaient bien sur le thé en fermentation, de choisir comme source de nourriture du jus de thé plus ou moins dilué, et que nous mélangions à d'autres substances selon les besoins de l'expérience. En outre, nous avons pensé que le jus de thé, par sa composition bien spéciale, s'opposerait peut-être au développement d'organismes étrangers, que justement nous devions éviter si possible dans nos cultures.

Pour opérer les triages, nous avons préparé un milieu nutritif constitué de jus de thé dilué (ordinairement 5% dans de l'eau), et nous ajoutions 2% d'agar-agar, en vue de le solidifier. Ce liquide, stérilisé à une température élevée, était versé dans des flacons spéciaux (1) stérilisés au préalable; en se refroidissant, il se solidifiait et formait la plaque nutritive qu'il s'agissait d'ensemencer. Avant d'expérimenter, il fallait toujours préparer un grand nombre de ces milieux, afin d'en avoir toujours sous la main une réserve suffisante. Le matériel de recherches consistait dans des feuilles de thé prises soit sur la plante dans les jardins, soit dans les cadres à flétrir, soit dans les rouleurs, soit dans les cadres à fermenter: quelques feuilles étaient lavées dans de petits tubes contenant un peu d'eau et stérilisés au préalable. Un peu de cette eau était versée sur une plaque d'agar nutritive; ce qui restait était fortement dilué avec de l'eau stérilisée et on ensemençait de nouveau une plaque; puis on diluait

Fermentation.

Cultures sur jus de thé plus ou moins dilué.

Préparation des milieux de culture.

1).— Ces flacons doivent avoir un fond suffisamment large pour que la plaque d'agar ait une surface assez étendue et que le matériel à ensemencer s'y étale bien. Ces flacons spéciaux peuvent avoir les formes les plus diverses.

Fermentation.

**Méthodes de
trianes.**

encore, on ensemençait, et ainsi de suite un certain nombre de fois. On comprend que les quelques gouttes d'eau du premier tube, contenant vraisemblablement un très grand nombre de microorganismes et ayant été versées sur la première plaque, il se développera sur celle-ci un si grand nombre de colonies qu'elles se toucheront et qu'il sera impossible de les distinguer les unes des autres (Fig. 3); mais les triages faits avec du matériel de plus en plus dilué, comporteront des colonies de moins en moins nombreuses, assez éloignées les unes des autres, et en général, après la 4^{me} ou la 5^{me} dilution, on finira par n'avoir plus sur la plaque que des colonies bien isolées (Fig. 4); comme, dans ces dilutions où l'eau a été bien agitée, les cellules de microorganismes sont bien séparées les unes des autres, il est vraisemblable que ces cellules auront été réparties isolées sur la plaque, et il est de toute probabilité que chaque colonie sera constituée de cellules appartenant à une seule et même espèce, puisqu'elles seront sans doute nées d'une seule cellule; cela n'est, je dois le dire, pas absolument certain, et quand on veut avoir la garantie indiscutable que les colonies sont parfaitement pures, il faut appliquer d'autres méthodes compliquées et qu'il n'est pas nécessaire d'exposer ici.

**Cultures en
stries.**

Quand on a obtenu ces colonies isolées, on les touche délicatement avec une pointe de platine qu'on a d'abord chauffée au rouge pour la stériliser, et on en fait une culture en strie sur d'autres plaques d'agar-agar nutritif préparées d'avance dans ce but dans des flacons ou dans des tubes ad hoc (1). (Je n'indique pas ici toutes les précautions qu'il faut prendre au cours des diverses opérations pour arriver à ne pas contaminer les cultures). Comme la pointe de platine a pris sur la colonie du triage un grand nombre de cellules, on aura sur les cultures en stries (Fig 5) un très

1).— Le plus commode consiste à prendre des tubes où l'on verse l'agar et qu'on fait refroidir en les plaçant obliquement, de façon à avoir une longue surface où il sera facile de faire une strie.

abondant développement de levures. Quelques-unes de ces cultures sans doute seront contaminées, soit accidentellement, soit parce que la colonie-mère n'était pas pure ; mais avec un peu d'habitude et en travaillant avec soin, on évitera dans une large mesure ce danger d'infection, et en tout cas on ne tiendra compte, pour la suite, que des cultures qui, par leur apparence macroscopique et par leur examen microscopique auront pu être considérées comme des cultures pures. C'est à partir d'elles qu'on pourra faire de nouvelles cultures en aussi grand nombre qu'il sera nécessaire, en variant les conditions de développement, en les ensemençant par exemple sur milieux liquides ou solides, sur des feuilles de thé, etc. Et si l'on prend les précautions de stérilisation prescrites, ces levures resteront pures dans les diverses cultures.

Avant d'aller plus loin, il importe d'insister encore sur un point : il ne faudrait pas se faire d'avance des illusions exagérées, même si les recherches auxquelles nous nous livrons arrivaient à donner des résultats positifs. Nous avons en note (P. 1) reproduit l'opinion de M. le Dr. Bosscha, et nous rappelons qu'il considérait la réussite des cultures de levures comme devant apporter une révolution dans l'industrie du thé ; il faisait à ce propos une comparaison entre le bouquet du vin et l'arôme du thé.

De cette discussion, on pourrait tirer des prévisions trop optimistes, et qui ne seront sans doute jamais réalisées, comme cela ressort des recherches concernant les levures du vin et de la bière, recherches poursuivies sur les microorganismes de la maturation du fromage et sur tant d'autres processus de fermentations ; rappelons en quelques mots l'exemple du vin ; nous le faisons d'autant plus volontiers que nous aurons à maintes reprises l'occasion, au cours de notre étude, de faire allusion à ce qui se passe dans la fermentation alcoolique. Au début des recherches sur les levures qui participent à la fermentation du vin, quand on avait isolé des moûts ces microorganismes, on avait

Fermentation.

Les divers essais d'ensemencement ne devront se faire qu'avec des cultures absolument pures.

Comparaison avec la fermentation du vin.

Fermentation.

La qualité du vin dépend avant tout du sol et du climat.

Le principal avantage de l'adjonction de levures sera d'activer la fermentation.

également fondé sur ces découvertes de grands espoirs ; on avait pensé pouvoir isoler les levures des bons crus qu'on aurait inoculées à des moûts de qualités très inférieures, ce qui aurait réussi à leur donner toutes les propriétés, toutes les qualités du bon vin ; mais on dut bientôt se convaincre qu'il fallait renoncer à espérer ces résultats miraculeux ; en cultivant les levures d'un bon cru de Bordeaux ou de Moselle, et en les inoculant à de mauvais moûts, on n'a obtenu avec ces derniers ni du Bordeaux ni du Moselle ; pas davantage en plantant dans une mauvaise vigne des plants de bon Bordeaux on n'obtiendrait dans cette vigne un vin sensiblement meilleur ; l'introduction des pieds américains en France n'a guère modifié la qualité des vins français ; et l'on dut donc conclure que la qualité du vin, sa force, et surtout son bouquet, ne dépendent avant tout ni du type de plantes ni de la fabrication, mais en première ligne des conditions extérieures de sol et de climat ; cela, évidemment, n'est pas absolu et de bons types de plantes, une fabrication soignée, influenceront dans une certaine mesure sur la qualité : il est vrai que des vignes d'un bon type donneront souvent des vins moins acides, que de bonnes levures introduites dans la fermentation pourront activer la fermentation, augmenter peut-être dans une certaine mesure la teneur en alcool, améliorer ainsi un peu la qualité ; mais le résultat qu'on pourra attendre de cette dernière opération sera d'abord d'éviter des retards de fermentation, retards qui pourraient donner aux mauvaises levures et aux bactéries de putréfaction le temps de se développer et peut-être de détruire une récolte. C'est là le principal avantage qu'on a retiré des cultures pures de levures de vin, et on peut prévoir qu'il en sera de même dans le thé si la suite des expériences vient démontrer que des levures jouent en effet un rôle dans sa fermentation. Mais il ne faudra pas en attendre davantage. Il ne faudra pas prévoir *a priori* que des levures prises dans une région où le thé est apprécié, et introduites

dans le thé d'une entreprise où le thé est de qualité inférieure, transformeront immédiatement ce dernier et en feront un produit égal au premier. Pas davantage l'introduction à Java de plantes d'Assam n'a fait des thés préparés ici l'équivalent des thés produits à Ceylan ou à Dardjeeling, et nous sommes obligés de conclure, ici aussi, que la qualité du produit ne dépend avant tout ni du type des plantes, ni de modifications dans les détails de fabrication, mais tout d'abord des conditions de sol et de climat. Nos thés de Java ont des qualités de force qui lui sont propres, et malheureusement on ne peut pas prévoir qu'il sera possible de leur communiquer, par l'introduction de levures de Ceylan, les qualités d'arome qui souvent lui manquent. Les résultats qu'on pourra attendre, si on arrive à démontrer que des levures jouent un rôle, seraient de même nature que ceux obtenus dans le vin: on serait le maître de la fermentation, on aurait la possibilité d'activer ce phénomène, par l'adjonction de levures soigneusement sélectionnées on éviterait ces fermentations de trop longue durée qui permettent à des bactéries de se développer après quelques heures en grande abondance et d'occasionner dans le thé des putréfactions qui donneront une mauvaise odeur au produit; Mann a déjà fixé l'attention sur l'intervention de ces putréfactions, et nous y reviendrons ci-dessous.

Et encore, si les levures en grand nombre sont susceptibles de hâter la fermentation du thé, conviendra-t-il d'être prudent et les entreprises qui travaillent pour la qualité du produit ne devront pas immédiatement transformer leurs manipulations, car si une fermentation rapide a certainement ses avantages, il restera à démontrer si elle n'a pas des inconvénients, notamment en ce qui concerne la qualité. Encore ici, nous ne saurions trop recommander de ne pas tirer des conclusions prématurées, qui pourraient donner des désillusions, mais d'établir

Fermentation.

De même chez le thé, la qualité dépend surtout des conditions sous lesquelles se trouve la plante.

L'adjonction de bonnes levures empêchera sans doute que des organismes nuisibles jouent un rôle trop important.

**Fermenta-
tion.**

dans les diverses fabriques des expériences méthodiques et comparables qui seules permettront de se faire une opinion définitive.

*
* *

J'en arrive maintenant à l'exposé de mes propres recherches et des résultats que l'on peut considérer comme acquis à ce jour.

Pasteurisation-
du jus de thé.

Il était nécessaire d'abord d'avoir le jus de thé qui me servirait à préparer mes milieux, et pour cela, je me rendis avec le matériel nécessaire à la fabrique de Srogol, où M. Valette fut assez aimable pour mettre à ma disposition toutes les facilités de travail. Dans des linges stérilisés, j'exprimai le jus de feuilles de thé prises à divers moments du roulage et de la fermentation, et je le récoltai dans des flacons également stérilisés, fermés avec un bouchon de ouate; tous les échantillons furent immédiatement pasteurisés, c'est à-dire chauffés pendant une heure environ à une température de 70° C. Il était nécessaire de les stériliser de cette manière et non pas en chauffant à de plus hautes températures, afin d'éviter autant que possible la décomposition ou la précipitation de substances qui ne manqueraient pas de se produire au-dessus de 100°. De retour au laboratoire, la pasteurisation fut répétée pendant un temps plus long, et je pus constater, après plusieurs jours, que les échantillons ainsi traités étaient suffisamment stériles, puisqu'ils avaient gardé leur bonne odeur, et qu'il ne s'y était développé ni bactéries ni autres organismes.

Préparation des
milieux de cul-
ture.

A partir de ces jus, je préparai toute une série de milieux solides, préparés de la manière suivante: je chauffais à haute température de l'agar-agar (2%) dans de l'eau, je distribuais cette gélose dans les récipients à cultures, et je stérilisais à haute température; puis, quand les flacons s'étaient refroidis à 60° environ, j'ajoutais aux uns environ 10%, aux

autres environ 5°/o ou d'autres proportions de mes différents échantillons stérilisés de jus de thé. Cette manière d'opérer était nécessaire, toujours pour éviter que le jus de thé ne fût porté à une température trop élevée et qu'il ne s'y passât des changements trop profonds, et aussi parce que ces jus sont acides, et que, si on chauffe un milieu agarisé acide à plus de 100° par exemple, la gélose s'hydrolise et ne se solidifie plus. A ce propos, je remercie M. de Kruijff, bactériologue à Buitenzorg, qui m'a fréquemment donné des conseils sur la manière de travailler.

Les milieux étant ainsi préparés, j'ai, dans la même fabrique, opéré des triages par dilutions, comme je l'ai indiqué ci-dessus, l'ensemencement étant fait à partir de feuilles prises à tous moments du roulage et de la fermentation; j'obtins ainsi, sur mes plaques, de belles colonies dont le triage s'est montré le plus avantageux sur des milieux où le jus de thé n'était pas trop concentré, car sur ces milieux la contamination par des moisissures était moins forte. Quant au développement des colonies, il était le plus fort sur des plaques où la substance nutritive était du jus provenant de thé en pleine fermentation. J'ai fait photographier (Fig. 3) un flacon de triage où les colonies sont trop près les unes des autres, et (Fig. 4) un autre flacon où le liquideensemencé était plus fortement dilué et où les colonies sont bien distinctes.

Les triages obtenus étaient surtout remarquables par une très grande abondance de colonies de levures par rapport aux autres organismes: sur toutes les plaques, ou à peu près, ensemencées à partir de thé en voie de roulage ou de pleine fermentation, le nombre des colonies de levures était énorme, tandis que les colonies de bactéries existaient, cela est certain, mais étaient excessivement peu nombreuses dans la plupart des cultures. Nous verrons plus loin quelle remarque on peut faire à ce sujet si l'ensemencement a eu lieu à partir de thé dont la fermentation a duré trop longtemps.

Fermentation.

Triage des microorganismes.

Sur tous les milieux nutritifs à base de jus exprimé des feuilles en voie de roulage ou de fermentation, il se développe surtout des colonies de levures.

Fermentation.

Une levure blanche-laitieuse caractéristique se manifeste dans tous les triages.

Dimensions des cellules de cette levure.

Observations faites sur du thé dont la fermentation a duré trop longtemps.

Immédiatement mon attention fut attirée par la présence, dans *presque tous* les triages, de nombreuses colonies d'un blanc laiteux, un peu brillantes et comme visqueuses d'apparence. Ces colonies, portées dans une goutte d'eau sous le microscope, se montrèrent constituées de petites cellules souvent parfaitement sphériques, mais plus ordinairement faiblement elliptiques, et qui bourgeonnaient à la façon classique des levures en d'élégants arbuscules à cellules souvent très nombreuses (Fig. 2). Les cellules qui, à l'état jeune, pouvaient être excessivement petites, mesuraient d'ordinaire, quand elles avaient atteint leur complet développement, environ $4-5\mu$ de long sur $3-4$ de large.

À part ces levures qui, je le répète, se trouvaient sur à peu près toutes les plaques de triage, et en grand nombre, il existait d'autres formes de levures, l'une par exemple formant une colonie rosâtre, sèche, et dont les cellules étaient un peu plus grandes que celles de la précédente; une autre formant des colonies un peu jaunâtres, etc.; mais toutes étaient toujours en un petit nombre de colonies et n'existaient pas sur toutes les plaques; seule la levure que j'appellerai „blanche-laitieuse” était constante et abondante, et c'est sur elle que j'ai pensé devoir porter tout d'abord mon attention, puisqu'elle semblait la plus importante.

En ce qui concerne des fermentations ayant duré trop longtemps, j'ai pu faire l'expérience suivante, qui me semble donner des indications assez intéressantes: le 28 avril, vers 10 heures du matin, j'avais mis dans des flacons du thé pris à la fin de la fermentation; le soir, ce thé avait encore une bonne odeur très prononcée, mais déjà comme un peu acide. Froissé entre les doigts, il avait une consistance gluante et le jus qui en était exprimé était un peu sirupeux; le goût en était assez aromatique, mais douceâtre, à peine astringent et à peine amer. Ce thé séché avait une odeur assez bonne, mais non absolument normale. Je mis un peu de jus exprimé

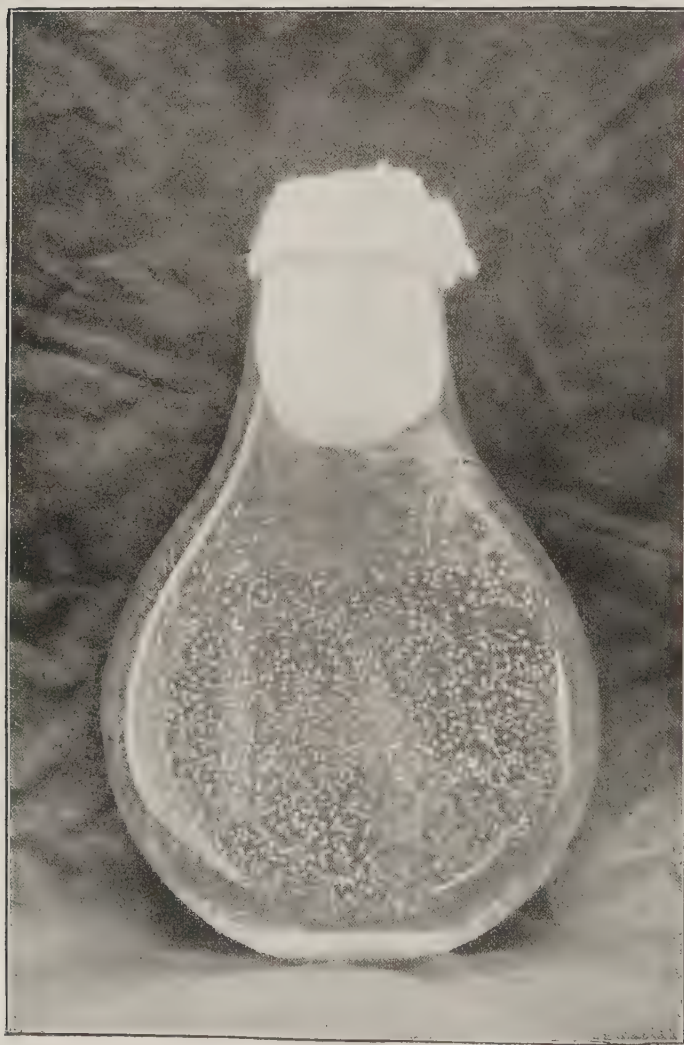


Fig: 3.



Fig: 4.

de ce thé dans un centrifuge et j'observai le dépôt au microscope; j'y constatai encore un grand nombre de levures en fort bourgeonnement, formant comme des grappes compliquées, mais à côté d'elles aussi une quantité exagérée de bactéries en bâtonnets très étroits, plus ou moins longs, quelquefois fixés bout à bout en filaments (Fig. 1).

Ce thé fut laissé jusqu'au jour suivant, et le matin du 29 avril, donc après une fermentation d'environ 24 heures, les caractères indiqués plus haut s'étaient accentués, tant en ce qui concerne la consistance de la feuille et du jus, qu'en ce qui concerne la présence des microorganismes; le dépôt obtenu à partir de ce jus centrifugé ne montrait plus qu'un petit nombre de cellules de levures, et une quantité énorme au contraire de bactéries. Le jour suivant, donc après 48 heures de fermentation, l'odeur était décidément gâtée et ces feuilles séchées donnaient une infusion qui n'avait plus ni goût ni arôme, sinon une mauvaise odeur de putréfaction.

Le soir du 28 avril, le 29 et le 30 avril, j'ai fait, à partir de ce thé, des triages et après quelque temps je pus constater que le nombre des colonies de bactéries sur les plaques augmentait très rapidement proportionnellement à celui des colonies des levures dont il n'y avait plus qu'un tout petit nombre pour le thé laissé 24 heures en fermentation, et plus du tout pour celui laissé 48 heures. Dans ce dernier cas, les bactéries étaient si abondantes que, même après 4 ou 5 dilutions, les triages étaient impossibles, les colonies se touchaient; en outre, tandis que l'odeur des triages où se développent les levures reste agréable, et souvent devient meilleure et s'accroît, l'odeur de ces plaques, où se développaient des bactéries, prenait rapidement l'odeur de pourri caractéristique du thé laissé trop longtemps en fermentation.

De cette observation, il est donc possible de tirer cette première conclusion pratique: dans quelques fabriques, j'ai entendu dire que la fermentation du

Fermentation.

Présence de bactéries.

Si la fermentation dure très longtemps, le nombre des bactéries augmente fortement tandis que la proportion des levures diminue.

On a tort d'admettre parfois comme un criterium de la fermentation la consistance gluante que peut prendre la feuille.

Fermentation.

La présence de **bactéries** dans le thé en fermentation doit autant que possible être évitée.

thé ne devait être arrêtée que lorsque la feuille était devenue un peu gluante au toucher. Je crois pouvoir affirmer que, dans ce cas, la fermentation a duré trop longtemps et qu'il faut mettre le thé dans les dessiccateurs avant qu'il soit devenu gluant, transformation qui est due au développement certainement néfaste des bactéries. Cette observation confirme partiellement en outre l'idée de Mann qu'on doit travailler dans les fabriques de thé de façon aussi aseptique que possible, c'est à dire que les cadres de fermentation doivent être lavés soigneusement chaque jour. En effet, si je frottais les cadres de fermentation qui ne subissaient pas ce nettoyage régulier avec un tampon de ouate humide, si ensuite j'agitais ce tampon dans de l'eau stérilisée et si, à partir de cette eau, je faisais des triages, j'obtenais il est vrai des colonies de levures, mais aussi et surtout des colonies de bactéries, celles-ci s'étant développées comme je l'ai indiqué cidessus dans le jus ayant séjourné sur les cadres.

Je dis que cela confirme partiellement l'opinion de Mann en ce sens que cet auteur n'a pas traité la question de façon complète et qu'il ne parle que des bactéries; je réserve mon avis en ce qui concerne les levures, et je ne veux point dire qu'il faut travailler aseptiquement vis-à-vis de *tous* les micro-organismes; j'en reviens à ma comparaison avec le vin, chez lequel on doit éviter si possible la présence de bactéries, mais favoriser le développement des bons germes; de même chez le thé, s'il est démontré dans la suite que des levures jouent un rôle utile dans la fermentation, il faudra se garder de les détruire et il faudra si possible favoriser leur développement; cela n'empêchera pas de laver soigneusement les cadres à fermentation pour les débarrasser des mauvais germes; en effet, comme nous le démontrerons, les levures se trouvent sur les feuilles dans les jardins, et elles se développent au cours du flétrissage et du roulage; en rendant aseptiques les instruments, on

ne détruira donc pas les organismes qui sont sur la feuille, et dont on pourra sans doute augmenter la quantité—et c'est à quoi tendront nos recherches—par des inoculations de cultures pures de levures sélectionnées qu'on ajoutera au thé en voie de fermentation.

Mais ce ne sont encore que des hypothèses, et des résultats positifs, s'ils sont jamais atteints, ne le seront peut-être que dans un avenir fort lointain.

Pour montrer l'importance de la levure blanche-laiteuse en question, je dirai que, dans une série de 50 triages faits à partir de thé à divers moments du roulage et de la fermentation (1), cette levure était très abondante dans 24 triages et passablement abondante dans 25. J'entends par très abondante que ces colonies existaient presque exclusivement et en très grand nombre, et par assez abondante qu'elles étaient en forte majorité. Les autres levures, dans leur ensemble, n'étaient qu'en très petit nombre (quelquefois une seule colonie) dans 16 triages seulement. Il n'y avait des bactéries un peu abondantes que dans 6 de ces 50 triages.

A partir de ces triages, je pus obtenir un grand nombre de cultures en stries des différentes espèces de microorganismes, mais surtout de la levure blanche-laiteuse qui nous intéresse plus spécialement. La figure 5 représente une série de cultures en stries faites à partir de cette levure.

Plus tard je préparai des milieux de constitutions variées et notamment les suivants:

A. Eau contenant 2% d'agar-agar et 5% de jus de thé de diverses provenances.

1). J'emploie les termes techniques de roulage et fermentation, bien que je ne veuille point les opposer l'un à l'autre, et je veux bien insister sur ce fait que le phénomène dit de fermentation n'est pas exclusivement limité au temps que le thé passe dans les cadres à fermenter; ce procès débute bien avant et se poursuit notamment pendant tout le temps du roulage, pour continuer ensuite dans les espaces plus spécialement destinés à cet effet.

Fermentation.

Importance de la levure blanche-laiteuse.

Cultures en stries.

Fermentation.

B. Idem, mais avec 10°/o de jus de thé.

C. Milieu artificiel contenant:

Phosphate de potassium	0,75	gr.
Sulfate d'ammonium	5,—	"
Sulfate de magnésium	0,1	"
Acide tartrique	1,—	"
Eau distillée.	1000,—	"
Agar agar	20,—	

D. Idem, mais additionné de 5—10°/o de jus de thé.

Tous ces milieux étaient préparés et stérilisés sans acides, c'est-à-dire sans jus de thé et sans acide tartrique, lesquels étaient stérilisés à part et additionnés après refroidissement.

Je pus constater que tous ces milieux se montraient favorables au développement de la levure blanche-laitieuse; je répartis ces solutions nutritives dans un grand nombre de flacons que j'emportai à Taloen où M. le Dr. J. Bosscha avait bien voulu m'autoriser à poursuivre mes recherches. J'avais l'avantage de m'y trouver dans des conditions satisfaisantes de travail en ce sens que l'altitude était très différente de celle de Srogol et que cela me permettait de comparer les résultats obtenus dans ces diverses circonstances; ensuite, j'étais là dans une fabrique à fermentation lente, mais dans le voisinage de fabriques à fermentation rapide, et justement de celle de Tanara où M. K. A. R. Bosscha avait fait cette intéressante observation que du thé fermenté de Malabar, apporté à Tanara, y avait activé la fermentation. Dans ces conditions si variées, je pouvais donc prévoir des observations intéressantes.

A Taloen, je fis un grand nombre de triages à partir du thé en voie de roulage et à divers moments de la fermentation; je répétais ces opérations à Tanara, où la fermentation ne dure que 30 minutes environ, tandis qu'elle dure près de 4 heures à Taloen.

Je pus d'abord faire les remarques suivantes en ce qui concerne la température: à Taloen, des feuilles qui avaient été roulées de 6 h. 30 à 7 h. 5 furent placées dans les cadres à fermenter; la tempé-

Comparaison des résultats obtenus sous des conditions très variables.

rature, assez élevée pendant le roulage, était, au commencement de la fermentation (à 8 h.), de 22,5° et à la fin de la fermentation (à 11 h.), de 26,5°. D'autres feuilles, roulées de 6 h. 50 à 7 h. 25, placées dans les cadres à 7 h. 30, avaient, à 8 h. 15, une température de 21,3°, et à 11 h. 15 une température de 25,5°.

A Tanara, du thé placé dans les cadres depuis 20 minutes, donc 10 minutes avant la fin de la fermentation, n'avait qu'une température de 22°.

Dix minutes plus tard, donc à la fin de la fermentation, la température était restée la même. Dans un autre cas, je constatai que le thé, au sortir du rouleur (il avait été roulé 45 minutes) avait une température de 28°; on le faisait alors passer dans les ball-breakers, et on le plaçait ensuite dans les cadres à fermenter, où il était intéressant de constater que la température ne s'élevait plus et restait inférieure à 22°. Comme, d'autre part, les circonstances extérieures (température de l'air, etc.) et les méthodes de travail étaient sensiblement les mêmes qu'à Taloen, il faut donc admettre que, à Tanara, les phénomènes dits de „fermentation” étaient terminés à la fin du roulage; à ce propos, il faut rappeler encore que, dans la fabrique de Radjamandala, la fermentation dans les cadres a été supprimée et que le thé passe directement du rouleur dans le ball-breaker, puis dans le dessiccateur.

Après deux jours, dans mes triages de Tanara, aussi bien que dans mes triages de Taloen, d'abondantes colonies s'étaient développées, et je pus me convaincre que, dans tous les cas, il existait encore la même levure blanche-laiteuse déjà constatée à Srogol. Mais je pus en même temps faire l'observation suivante qui peut-être a son importance: à Tanara, où la fermentation est rapide, le nombre des colonies de cette levure était, dans tous les triages, plus grand relativement que dans les triages correspondants de Taloen.

Faut-il dès maintenant tirer de cet argument une conclusion positive? Je ne le crois pas, car d'abord

Fermentation.

Relation entre la température et la durée de la fermentation.

La levure blanche-laiteuse se rencontre dans des fabriques qui sont dans les conditions les plus différentes.

Fermentation.

Le nombre des cellules de levures semble augmenter au cours des diverses manipulations que subit la feuille.

les triages, pour que le résultat pût être considéré comme définitivement acquis, devraient être répétés à plusieurs reprises et numériquement, et ensuite, il est imprudent de tirer des conclusions de l'observation de faits isolés, et non pas d'expériences méthodiques. Tout au plus, ce résultat est-il une indication, dont il est intéressant de tenir compte, mais qu'il serait prématuré de regarder comme une preuve absolue.

J'ai dit plus haut que la levure en question existe sur les feuilles de thé dans les jardins et qu'elle se multiplie au cours des diverses manipulations que subit le produit. Et je m'appuie pour l'affirmer sur l'essai suivant:

J'ai fait une série de triages,

1° à partir de feuilles prises dans le jardin, assez loin de la fabrique.

2°	„	à demi-flétries,
3°	„	flétries,
4°	„	à demi-roulées,
5°	„	roulées,
6°	„	à demi-fermentées
7°	„	fermentées.

Je n'ai pas fait cet essai assez exactement pour pouvoir en tirer des données numériques et l'expérience devra être répétée dans ce sens-là; cependant, il était évident, en examinant les triages successifs après deux jours, — c'est-à-dire lorsque les colonies étaient suffisamment développées, — que le nombre des colonies de la levure blanche-laiteuse augmentait assez régulièrement du premier au dernier de ces triages, et j'en conclus qu'au cours des divers procès de fabrication, les levures se développaient régulièrement. Il me semble, comme je l'ai déjà dit, que cette observation enlève de sa force à un argument que l'on a avancé pour refuser aux microorganismes un rôle dans la fermentation; je ne voudrais cependant pas affirmer péremptoirement que cette observation

Les observations devront être contrôlées par des triages numériques.

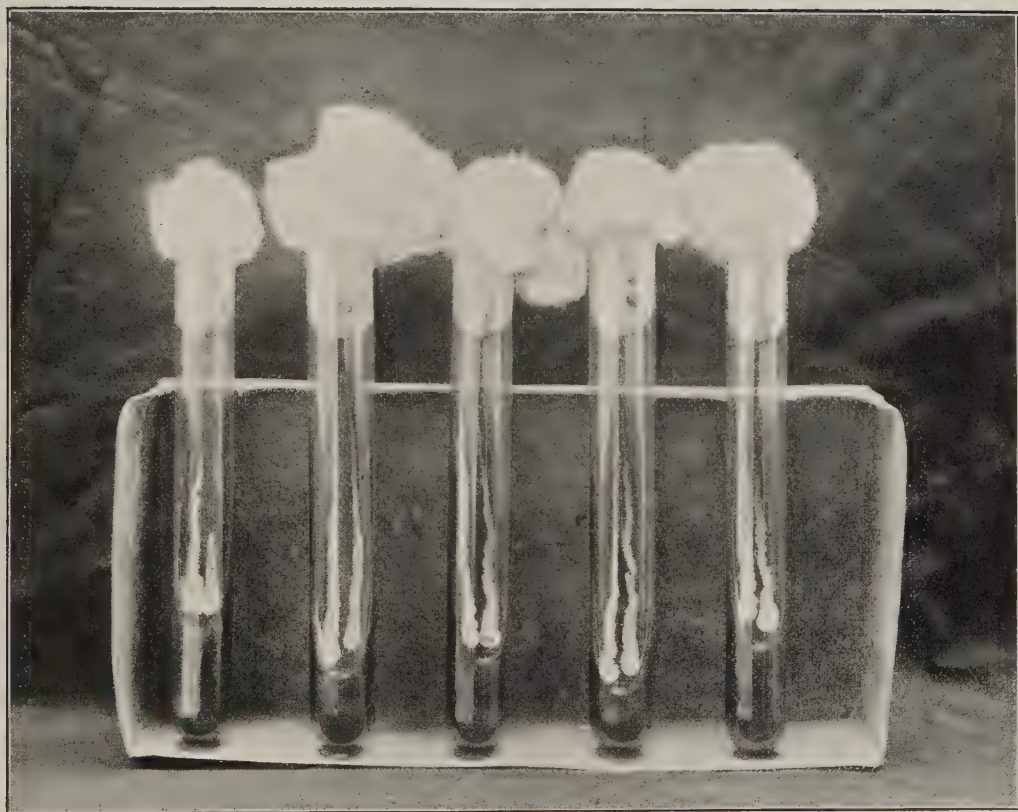


Fig: 5.

réfute absolument l'argument en question: on a dit que le procès de fermentation du thé est trop court pour que les microorganismes puissent se développer en quantité suffisante et exercer dans le phénomène une action efficace. Mais, s'il est démontré que les levures se développent en abondance pendant les 24 heures que dure le flétrissage, que pendant ce temps peut-être elles commencent à agir; s'il est démontré que, dans les fabriques où le thé fermente vite, les conditions de flétrissage sont justement celles qui favorisent le plus le développement des levures, ne pourra-t-on tirer de ces faits un peu plus qu'une indication et admettre que, dans ces conditions, le développement des levures est énorme pendant 24 heures, et que, au moment du commencement du roulage, moment où commence la fermentation proprement dite, ces microorganismes sont en quantité considérable et qu'ils pourront agir énergiquement et rapidement; l'argument négatif en question perd donc de sa force. Ceci n'est encore, il est vrai qu'une hypothèse, mais peut-être sera-t-il possible de la démontrer.

De Taloen, j'avais 30 triages dont 20 avaient la levure blanche-laitieuse très abondante et 6 l'avaient assez abondante; de Tanara, mes 12 triages avaient tous cette levure blanche extraordinairement abondante. A Taloen comme à Tanara, d'autres levures et des bactéries étaient remarquablement rares.

Comme, dans les deux fabriques, cette levure existe, mais qu'à Tanara elle est beaucoup plus abondante, on peut se demander si la race de Tanara est plus prolifique que celle de Taloen ou si peut-être les feuilles dans les jardins en sont plus abondamment couvertes. Il sera nécessaire de faire des triages numériques pour résoudre cette question, et aussi par exemple d'inoculer des cultures pures de levures de Tanara aux rouleurs de Taloen pour voir si le temps de fermentation y sera diminué.

**Fermenta-
tion.**

La multiplica-
tion des levures
a peut-être lieu
abondamment
au cours du
flétrissage.

Fermentation.

Un dégagement de gaz se manifeste dans du jus exprimé de thé en voie de fermentation.

Les levures se développent avec abondance dans du jus de thé

A Taloen, j'ai encore pu faire une constatation qui se trouve peut-être en rapport avec la présence des levures et que j'ai déjà signalée: le jus de thé exprimé au cours du roulage avait une teinte verdâtre bien nette. Exprimé au milieu ou à la fin de la fermentation, il prenait une belle couleur d'un brun-rougeâtre, la couleur „cuivre” caractéristique; les premiers échantillons montraient un dégagement de bulles de gaz bien typique, comme dans une fermentation alcoolique; le jus exprimé au milieu de la fermentation n'avait qu'un très faible dégagement gazeux qui avait cessé dans le jus pris à la fin de la fermentation. Nous avons déjà parlé, P. 15, de ce dégagement gazeux.

Le jus exprimé des feuilles en voie de roulage, et placé dans une éprouvette, montrait encore pendant quelque temps ce dégagement gazeux en même temps que le suc prenait une teinte rougeâtre de plus en plus foncée et que son arôme augmentait; donc, dans ce jus, il se produisait le même phénomène que dans les feuilles; après deux ou trois heures, le phénomène était terminé, le jus était identique comme couleur et comme arôme aux jus exprimés au cours de la fermentation et il n'était plus possible d'y voir le dégagement gazeux; il était alors intéressant de constater dans le dépôt qui s'était formé au fond de ces éprouvettes une quantité considérable de cellules de levures, infiniment plus nombreuses que celles du dépôt constaté dans le jus exprimé à partir de feuilles fraîches.

A Tanara, le jus exprimé à la fin du roulage avait déjà sa couleur cuivre caractéristique et le développement de gaz y était presque nul.

Ces observations ne constituent, elles non plus, pas encore des preuves; ce sont toujours des indications: s'il était démontré qu'il s'agit dans ce phénomène d'une fermentation provoquée par des levures, ne pourrait-on pas dire qu'elle est en pleine activité, en pleine effervescence, — pour employer l'expression consacrée dans la fermentation du vin, — au cours du roulage, et qu'elle se manifeste alors par le déve-

loppement gazeux; elle serait terminée après un temps plus ou moins long selon les fabriques, et la fin du phénomène serait marquée par l'obtention de l'arome et de la couleur désirés et par la cessation du dégagement gazeux.

Je me figure que, dans l'observation de ce dégagement gazeux dans le jus, il y aurait un procédé facile de contrôle de fabrication pour établir le moment où la fermentation doit être arrêtée; ce serait tout aussi facile et en tout cas plus exact de constater la cessation du dégagement que d'estimer la fermentation par l'odeur, la couleur, procédés toujours un peu empiriques ou arbitraires, ou par l'apparition de la consistance gluante de la feuille, viscosité qui indique déjà, à mon avis, une fermentation de trop longue durée.

Nous serions heureux si quelques planteurs voulaient faire des essais à ce sujet et nous communiquer leurs résultats; il suffirait, à divers moments de la fermentation, d'exprimer dans une éprouvette, un peu de jus et de voir si la cessation de bulles de gaz coïncide de façon constante avec la fin de la fermentation, jugée par les caractères ordinaires.

J'avais laissé pendant 24 heures les éprouvettes contenant ce jus de thé, sans les stériliser, et après ce temps, l'arome du jus était toujours excellent; il me semblait même meilleur et plus fort, et au fond des tubes, le dépôt de levures était beaucoup plus considérable qu'après 3—4 heures. Il n'y avait certainement pas encore eu dans ce jus de putréfaction, de décomposition par l'intervention de bactéries. Cela peut sembler contradictoire avec ma précédente affirmation que, si la fermentation dure trop longtemps, les bactéries entrent en jeu et exercent des actions désavantageuses; mais ce n'est en réalité pas une contradiction, car le jus n'est pas absolument comparable à la feuille; dans celle-ci, il y a des matières organiques beaucoup plus abondantes que dans le jus, matières qui se pourrissent les premières et pro-

Fermentation.

Le dégagement de gaz pourrait peut-être servir comme criterium indiquant que la fermentation est achevée.

Après 24 heures, sous un climat froid, le jus de thé ne manifeste pas trace de putréfaction.

Fermentation.

voquent la putréfaction de toute la masse; en outre, les tannins qui, dans une certaine mesure et sous une certaine concentration, entravent le développement des bactéries sont en un pourcentage beaucoup moins fort dans la feuille que dans l'extrait. Il semble donc, d'après cette expérience, qu'on pourrait laisser sans inconvénient et peut-être avec avantage, du jus de thé en fermentation pendant 24 heures (au moins sous le climat frais de Taloen, à une altitude de 5000 pieds), et cela se trouve en relation avec le mode de faire qui nous a été signalé et que nous avons exposé plus haut (P. 14): adjonction au thé en fermentation de jus extrait le jour précédent. On ajouterait ainsi au thé une quantité de levures, sans augmenter notablement le nombre des bactéries. Mais je répète que sans doute à une altitude inférieure, dans la chaleur, le jus ne se garderait pas si longtemps sans se pourrir.

A partir de mes triages de Taloen et de Tanara, j'ai pu faire un grand nombre de cultures en stries de la levure blanche-laiteuse qui présentait exactement les mêmes caractères macro- et microscopiques que celle récoltée à Srogol. J'ai dit qu'on détermine systématiquement les levures par le pouvoir fermentescible qu'elles exercent sur divers sucres, et par la formation des spores. Il était donc nécessaire d'appliquer ces méthodes à cette levure pour essayer de l'identifier à une levure déjà connue, ou de la caractériser comme nouvelle; ces essais ne sont pas achevés, et j'expose seulement ce que j'ai fait à ce propos jusqu'ici: j'ai préparé des milieux liquides (sans agar-agar) contenant les substances suivantes:

La levure blanche-laiteuse n'a pas formé de spores, et n'a pas provoqué la fermentation des sucres.

Peptone	1 %
Asparagine	1/2 %
Phosphate de potassium	1/20 %
Sulfate de magnésium	traces
Chlorure de calcium	traces

Le tout dissout dans l'eau distillée. J'y ajoutais une proportion de 20 % de sucres variés, ou de substances

voisines des sucres; j'ai employé les substances suivantes: Saccharose, Glucose, Mannite, Lactose, Dextrine, Maltose, Galactose; dans les sept milieux ainsi obtenus, j'aiensemencé ma levure blanche-laiteuse; dans tous elle s'est fort bien développée, plus ou moins abondamment suivant le milieu; selon les cas, elle formait des dépôts ou des voiles, mais n'a réussi à donner la fermentation d'aucune de ces substances. Je n'ai pas davantage réussi à obtenir de spores de cette levure; pour cela, on met des plaques de porcelaine poreuse ou de plâtre dans des tubes avec de l'eau distillée, mais sans substances nutritives; sur la surface humide on ensemence en abondance des cellules de levures, et après quelque temps, on les examine au microscope; si l'expérience a réussi, on voit que les cellules primitives de la levure contiennent alors un certain nombre de cellules (en général 4) qui sont les spores; j'ai toujours trouvé ces cellules sans spores et je suis arrivé, en considérant l'absence de pouvoir fermentescible et l'absence de spores, à la conclusion que je ne suis probablement pas en présence d'un *Saccharomyces*. Ces recherches de détermination seront poursuivies.

Enfin, je dois ajouter que, dans les fabriques de Tjikadjang et de Tjisaroeni, donc dans un district bien différent encore de ceux où j'avais déjà travaillé, j'ai fait de nouveaux triages, et que, dans ces deux entreprises, j'ai pu constater dans tous les triages, mais surtout dans ceux faits à partir de thé au milieu ou vers la fin de la fermentation, une très grande abondance de la même levure blanche-laiteuse déjà observée ailleurs.

Je veux enregistrer encore une observation qui peut-être aura son importance: j'avais préparé des milieux constitués comme ci-dessus avec de la peptone, de l'asparagine, du phosphate de potassium, du sulfate de magnésium et du chlorure de calcium, et je les avais solidifiés sans y ajouter de sucres, au moyen de 2% d'agar-agar. A certains de ces

Fermentation.

Préparation des milieux sucrés.

La levure blanche-laiteuse se développe le mieux sur des milieux contenant du jus de thé.

**Fermenta-
tion.**

milieux j'avais ajouté du jus de thé, et sur tous j'ensemençai la levure qui nous intéresse. Je pus constater que, sur les milieux sans jus de thé, les colonies se développaient sensiblement moins bien et moins rapidement que sur les autres milieux ; il sera nécessaire de rechercher à quoi tient cette différence et de savoir ce qui manquait à ces levures sans jus de thé ; peut-être y a-t-il un rapport entre ce mauvais développement et l'absence dans ces milieux de tannins ou de théine, ou de telle autre substance qui se trouve dans la feuille du théier.

R É S U M É.

La fermentation du thé est, comme nous l'avons vu, un phénomène dont les détails ne sont pas encore connus; des expériences ont démontré qu'elle repose sur des procès d'oxydation, et actuellement, on considère que des ferments solubles, du groupe des ferments oxydants, favorisent ou activent ces oxydations; mais certains faits permettent d'admettre la possibilité que des microorganismes participent eux aussi dans une mesure qui devra être déterminée, au phénomène; il se pourrait que, tandis que les ferments solubles ont une action sur certaines des substances de la feuille de thé, les microorganismes aient un effet sur d'autres substances et notamment, comme on l'a supposé, qu'elles jouent un rôle dans le développement de l'arome (1). C'est la présence simultanée des ferments oxydants et des microorganismes qui rend la question compliquée, car il est difficile d'établir des expériences permettant de séparer de façon bien nette leurs actions respectives.

Parmi les microorganismes, nous avons réussi à isoler une levure qui se trouve sur les feuilles de thé dans les jardins, et qui se développe abondamment au cours des diverses manipulations. Cette levure semble constante dans les différentes plantations et sous les circonstances les plus diverses, et elle n'exerce en tout cas pas d'action défavorable sur le thé en voie de fermentation. Il en est autrement d'un autre groupe de microorganismes, les bactéries, qui certainement sont désavantageuses si elles se développent abondamment dans le thé en fermentation; elles lui donnent une mauvaise odeur et une consistance visqueuse bien caractéristiques. Nous en arrivons donc à ce premier résultat, c'est que la fermentation doit être arrêtée en tout cas avant que la feuille ait pris cette apparence visqueuse. Si, dans la suite, les expériences démontrent que les levures exercent une action décidément favorable, nous devons en conclure que le travail dans la fabrique devra

1).— A ce propos, je veux remarquer que M. Betting, dans un des derniers numéros du *Cultuurgids* (1909, II, 10) a émis également la supposition que, pour la fermentation du tabac, le phénomène pourrait être aussi de double nature. Il est intéressant de constater combien la question se pose de façon identique pour le thé et pour le tabac, et combien, de part et d'autre, elle est peu connue. Cet auteur s'exprime en ces termes: „La possibilité n'est pas exclue que le procès puisse être en partie attribué à l'effet de microorganismes. Il ne serait pas impossible que, dans la fermentation du tabac, il faille penser à l'action simultanée de deux phénomènes: un enzymatique et un bactériologique”.

être si possible aseptique en ce qui concerne les bactéries, et devra tendre au contraire à augmenter le nombre des levures. On arrivera à ce résultat en faisant des inoculations de cultures pures de ces organismes. Mais, comme je l'ai dit, il faut attendre avant de tirer cette conclusion optimiste que des expériences soient venues la démontrer, et jusqu'à présent, les quelques essais entrepris n'ont donné à ce point de vue que des indications et non pas des preuves indiscutables.

Pour arriver à des résultats, nous nous proposons de faire les essais suivants :

Isoler les divers ferments solubles de la feuille de thé, étudier leur action et la comparer avec celle des levures que nous avons pu obtenir en culture pure.

Ajouter à des feuilles fraîches, ou à des feuilles flétries, ou à des feuilles prises à divers moments du roulage ou de la fermentation, d'une part des ferments oxydants, d'autre part des levures et comparer les résultats.

Faire de même avec des jus exprimés des feuilles à divers moments de leur préparation.

Faire de même avec des feuilles ou des jus de feuilles stérilisés par divers procédés.

Répéter les expériences déjà faites par divers auteurs sur ce sujet. Etudier par des triages numériques si, dans les fabriques où la fermentation est rapide, les levures sont plus abondantes à un certain moment de la fabrication que dans les fabriques où la fermentation est lente. Tenir compte, pour évaluer la fermentation, des différents facteurs, comme la couleur, la température, l'odeur, et non pas d'un seul; car si nous considérons la couleur seule par exemple, nous ne pouvons admettre que ce soit un caractère infaillible pour dire que le thé est fermenté quand il est devenu brun, puisque les tannins s'oxydent directement à l'air en brunissant.

Au cours de cette étude, on le voit, une foule de questions se posent qu'il ne faut pas considérer *a priori* comme résolues, mais qu'il faut résoudre en se basant sur des expériences méthodiques. Dans cette note préliminaire, nous n'avons fait qu'esquisser le sujet et nous proposons de reprendre en détail par la suite l'étude des divers points.
